

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(12)

(51) 国際特許分類6 C07K 16/40, C12N 15/08, C12P 21/08, G01N 33/536, 33/573	A1	(11) 国際公開番号 WO97/16461 (43) 国際公開日 1997年5月9日(09.05.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/03190 (22) 国際出願日 1996年10月31日(31.10.96) (30) 優先権データ 特願平7/283859 1995年10月31日(31.10.95) JP 特願平8/57841 1996年3月14日(14.03.96) JP 特願平8/147689 1996年6月10日(10.06.96) JP 特願平8/221530 1996年8月22日(22.08.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) マルハ株式会社(MARUHA CORPORATION)[JP/JP] 〒100 東京都千代田区大手町一丁目1番2号 Tokyo, (JP) 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE)[JP/JP] 〒565 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号 Osaka, (JP)	(72) 発明者：および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 織田浩司(ODA, Hiroshi)[JP/JP] 佐藤信行(SATO, Nobuyuki)[JP/JP] 西川正純(NISHIKAWA, Masazumi)[JP/JP] 清水興介(SEIKI, Kosuke)[JP/JP] 〒300-42 茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社 中央研究所内 Ibaraki, (JP) 裏出良博(URADE, Yoshihiro)[JP/JP] 〒604 京都府京都市中京区西洞院通蛸薬師下ル古西町440 藤和シティーコープ706 Kyoto, (JP) 佐治文隆(SAJI, Fumitaka)[JP/JP] 〒662 兵庫県西宮市上ケ原四番町4-33-308 Hyogo, (JP) (74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, BR, CA, CN, JP, KR, MX, NO, US, VN, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54)Title: MONOCLONAL ANTIBODY SPECIFIC FOR PROSTAGLANDIN D SYNTHETASE (54)発明の名称 プロスタグランジンD合成酵素に特異的なモノクローナル抗体 (57) Abstract A monoclonal antibody specifically recognizing a cerebral prostaglandin D synthetase; hybridomas producing the monoclonal antibody; a method for detecting a cerebral prostaglandin D synthetase or diseases which comprises detecting the synthetase with the use of the monoclonal antibody; and a kit for detecting a cerebral prostaglandin D synthetase which contains the monoclonal antibody.		

(57) 要約

本発明は、脳型プロスタグランジンD合成酵素を特異的に認識するモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該モノクローナル抗体を用いて脳型プロスタグランジンD合成酵素を検出することを特徴とする脳型プロスタグランジンD合成酵素の検出方法若しくは疾患の検出方法、並びに該モノクローナル抗体を含む脳型プロスタグランジンD合成酵素検出キットに関する。

本発明により、脳型プロスタグランジンD合成酵素に特異的なモノクローナル抗体が提供される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	LS	レソト	SD	スーダン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GB	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BB	バルバドス	GE	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BE	ベルギー	GR	ギリシャ	MD	モルドバ	SN	セネガル
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MK	マケドニア	TD	チャド
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	VI	ヴィア共和国	TG	トーゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	ML	マリ	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	IT	イタリア	MR	モリタニア	TR	トルコ
CF	中央アフリカ共和国	JP	日本	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CH	スイス	KG	キルギスタン	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボアール	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NL	オランダ	US	米国
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KZ	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CZ	チェコ共和国	LI	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ	LK	スリランカ	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

明 細 書

プロスタグランジンD合成酵素に特異的なモノクローナル抗体

技術分野

本発明は、脳脊髄液に主要に存在する脳型プロスタグランジンD合成酵素に特異的なモノクローナル抗体、該モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ、該モノクローナル抗体を用いた脳型プロスタグランジンD合成酵素の検出方法及び各種疾患の検出方法並びに該モノクローナル抗体を含む脳型プロスタグランジンD合成酵素検出キットに関する。

背景技術

プロスタグランジンDは、各種の刺激により生体膜から遊離するアラキドン酸から動物組織で合成される生理活性物質であり、プロスタグランジンH（シクロオキシゲナーゼによって生産されるプロスタグランジン類の共通の前駆体）からプロスタグランジンD合成酵素によって生産される。

プロスタグランジンD合成酵素には、グルタチオン非依存型の脳型プロスタグランジンD合成酵素及びグルタチオン依存型の脾臓型プロスタグランジンD合成酵素の二種類が存在することが知られている [Shimizu et al., J. Biol. Chem., 254, 5222-5228 (1979)、Urade et al., J. Biol. Chem., 260, 12410-12415 (1985)、Christ-Hazelhof and Nugteren, Biochim. Biophys. Acta, 572, 43-51 (1979)、Urade et al., J. Biol. Chem., 262, 3820-3825 (1987)]。そして、前者は、脳、副睾丸、脊髄、網膜又は内耳などの主として中枢神経系を中心に分布することが知られており [Urade et al., J. Biol. Chem., 260, 12410-12415(1985)、Ueno et al. J. Neurochem., 45, 483-489(1985)、Urade et al., J. Biol. Chem., 262, 3820-3825(1987)、Goh et al., Biochim. Biophys. Acta, 921, 302-311(1987)、Tachibana et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7677-7680 (1987)]、後者は、脾臓、骨髓、消化器、胸腺又は皮膚などのほぼ全身の末梢臓器に幅広く存在することが知られている [Ujihara et al., Arch

. Biochem. Biophys., 260, 521-531(1988)、Ujihara et al., J. Invest., Dermatol., 90, 448-451(1988)]。

一方、以前からヒト脳脊髄液に β -トレースと呼ばれるタンパク質が特異的に存在することが確認されていたが、その生理的機能は不明であった [Causen, J., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 107, 170-172 (1961)]。

従来、脳の重篤な障害やある種の病態（多発性硬化症、脳腫瘍、メッケル症候群、パラプロテイン血症）での β -トレースの増減から、これらの疾病と脳脊髄液特異的タンパク質として知られていた β -トレースとの関連性が指摘されていた [Ericsson et al., Neurology, 19, 606-610(1969)、Olsson et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 37, 302-311 (1974)、Link, J. neurol. Sci., 16, 103-114 (1972)、Whistlesed and Penny, Clinica Chimica Acta, 50, 111-118 (1974)、Chemke et al., Clinical Genetics, 11, 285-289 (1977)]。しかし、 β -トレースの生理機能が不明であるのみならず、 β -トレース含量（濃度）を正確に測定する材料を持たなかったため、前記疾患と β -トレースとの関連が決定されるまでには至らなかった。

最近、ヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素をコードするcDNAの塩基配列が示され [Nagata et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4020-4024 (1991)]、遺伝子組換えによるヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素の生産が可能となった。このため、ヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素の予想されるアミノ酸配列と、ヒト β -トレースアミノ末端側のアミノ酸配列とのホモロジー検索 [Kuruvilla et al., Brain Research, 565, 337-340 (1991)、Zahn et al., Neuroscience Letters, 154, 93-95 (1993)] 又は精製したヒト β -トレースとの比較 [Hoffmann et al., J. Neurochem., 61(2), 451-456 (1993)] が行われ、更に、ポリクローナル抗体を用いた免疫学的調査 [Watanabe et al., Biochem. Biophys. Res. Communication, 203, 1110-1116(1994)] が行われた。その結果、ヒト β -トレースは、ヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素と同一であることが明らかとなった。

中枢神経系に多く存在するプロスタグランジンDの生理作用の一つは、睡眠行動を含む中枢活動のニューロモジュレーターとして機能することである。そして

、プロスタグランジンD合成酵素は、睡眠と覚醒の鍵を握る酵素であると考えられており [Hayaishi, FASEB J., 5, 2575-2581(1991)]、担当細胞から分泌された脳型プロスタグランジンD合成酵素の少なくとも一部は脳脊髄液中に集まるものと考えられている [Watanabe et al., Biochem. Biophys. Res. Communication, 203, 1110-1116(1994)]。

したがって、脳型プロスタグランジンD合成酵素の中枢系での分布などを解析することは、中枢系疾患を検出できる点で有用であるばかりでなく、他の中枢系に異常がある疾病に関しても脳脊髄液や体液中の脳型プロスタグランジンD合成酵素の増減を指標とすることで、かかる疾病の早期診断や予後観察等を行うことが期待できる。また、 β -トレースおよび脳型プロスタグランジンD合成酵素は、精液や卵管液、羊水などの生殖器関連体液にも分布することから、生殖能力の判定や、胎児の発育診断などの利用も考えられてきた。そのためには、脳型プロスタグランジンD合成酵素を特異的に認識する抗体の調製が望まれている。

しかし、これまで、特異性の高い抗体を得るという観点からは、このような抗体群は未だ確立されていない。

発明の開示

本発明は、脳型プロスタグランジンD合成酵素を特異的に認識するモノクローナル抗体、該抗体を産生するハイブリドーマ、該モノクローナル抗体を用いた脳型プロスタグランジンDの検出方法及び各種疾患の検出方法並びに該モノクローナル抗体を含む脳型プロスタグランジンD合成酵素検出キットを提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題に基づいて鋭意研究を行った結果、ヒト脳脊髄液主要タンパク質である脳型プロスタグランジンD合成酵素で免疫された動物から得られた抗体産生細胞と、ミエローマ細胞とを融合し、得られるハイブリドーマから脳型プロスタグランジンD合成酵素と特異的に反応するモノクローナル抗体を得ることに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、脳型プロスタグランジンD合成酵素を特異的に認識するモノクローナル抗体である。ここで、該モノクローナル抗体のサブクラスとして

は、免疫グロブリンG 1又はG 2のものが挙げられる。

さらに、本発明は、脳型プロスタグランジンD合成酵素で免疫した動物から得られる抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合により得られる該モノクローナル抗体産生ハイブリドーマである。

さらに、本発明は、前記モノクローナル抗体を用いて脳型プロスタグランジンD合成酵素を検出することを特徴とする脳型プロスタグランジンD合成酵素の検出方法又は疾患の検出方法である。疾患としては、例えば乏精子症が挙げられる。

さらに、本発明は、前記モノクローナル抗体を酵素で標識した酵素標識化抗体及び基質溶液を含む試薬、又は前記モノクローナル抗体をビオチン化した抗体、酵素標識化アビジン及び基質溶液を含む試薬から選ばれる脳型プロスタグランジンD合成酵素検出キットである。

さらに、本発明は、前記脳型プロスタグランジンD合成酵素検出キットを用いて疾患を検出することを特徴とする疾患の検出方法である。疾患としては、例えば乏精子症が挙げられる。

以下、本発明を詳細に説明する。

1. モノクローナル抗体の製造

本発明の抗脳型プロスタグランジンD合成酵素モノクローナル抗体は、次の各工程を経て製造される。

- (1)抗原の調製
- (2)免疫及び抗体産生細胞の採取
- (3)抗体価の測定系の設定
- (4)細胞融合
- (5)ハイブリドーマの選択及びクローニング
- (6)モノクローナル抗体の採取

以下、各工程について説明する。

(1) 抗原の調製

先に取得され、公知の脳型プロスタグランジンD合成酵素 c D N A [Nagata e

t al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4020-4024 (1991)]を常法に従い、大腸菌、CHO細胞等を用いて大量調製できる。すなわち、脳型プロスタグランジンD合成酵素cDNAを含む組換え体を作製し、該組換え体によって形質転換された形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から通常の前製手法を用いることにより、脳型プロスタグランジンD合成酵素を精製することができる。

得られたプロスタグランジンD合成酵素を緩衝液に溶解し、ついでアジュバンドを添加する。アジュバントとしては、市販のフロイント完全アジュバンド、フロイントの不完全アジュバンド、BCG、ハンターズ タイターマックス (CytRx 社製)、キーホールリンペットヘモシアニン含有オイル等が挙げられ、これらの何れのものでも混合してもよい。

(2) 免疫及び抗体産生細胞の採取

上記のようにして得られた免疫原を哺乳動物、例えばウマ、サル、イヌ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、モルモット、ハムスター若しくはマウスなどの哺乳動物、又はハト若しくはニワトリなどの鳥類に投与するが、特にマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギなどが使用上好ましい。免疫は、既存の方法であれば何れの方法をも用いることができるが、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入するのが好ましい。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、好ましくは1週間～3週間間隔で、2～10回、好ましくは2～5回免疫する。

最終の免疫日から1～10日後、好ましくは2～5日後に、抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、胸腺細胞、末梢血細胞が挙げられるが、一般的に脾臓細胞を用いることが多い。抗原の免疫量は1回にマウス1匹当たり、10ng～1000 μ g、好適には1～300 μ g用いるのが好ましい。

(3) 抗体価の測定系の設定

免疫した動物の免疫応答レベルの確認、また、細胞融合処理後の細胞からの目的ハイブリドーマの選択のためには、免疫した動物の血中抗体価、又は抗体産生細胞の培養上清中の抗体価を測定する方法を確立しなければならない。抗体検出の方法としては公知技術例えば、EIA (エンザイムイムノアッセイ)、RIA

(ラジオイムノアッセイ)、E L I S A (酵素連結イムノソルベントアッセイ)、F I A (蛍光抗体法)等を一般的に用いることができる。本発明では上記方法に限定されないが、一般にE L I S Aが簡便である点で好ましい。通常、96穴のプラスチック製のマイクロタイタープレートの各ウェルに脳型プロスタグランジンD合成酵素を添加して室温に放置し、固相化する。仔ウシ血清アルブミン若しくはウシ胎児血清又はスキムミルク又はゼラチン等を用いて抗原非結合部位をブロッキングし、ついで、リン酸緩衝液(以下「P B S」という。)で希釈した抗血清又はハイブリドーマ培養上清等をマイクロタイタープレート上の固相体に添加する。更に、P B Sで希釈した市販の酵素又は蛍光若しくはビオチン標識化抗体を添加し、発色基質を加えて発色させ、抗脳型プロスタグランジンD合成酵素抗体の存在量を分光光度計や蛍光光度計等で測定することが出来る。

(4) 細胞融合

抗体産生細胞と融合させるミエローマ(骨髓腫)細胞として、マウス、ラット、ヒトなど種々の動物に由来し、当業者が一般に入手可能な株化細胞を使用する。使用する細胞株としては、薬剤抵抗性を有し、未融合の状態では選択培地(例えばH A T培地)で生存出来ず、抗体産生細胞として融合した状態でのみ生存出来る性質を有するものが好ましい。一般的に8-アザグアニン耐性株が用いられ、この細胞株は、ヒポキサンチン-グアニンホスフォリボシルトランスフェラーゼを欠損し(HGPRT-)、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン(H A T)培地に生育できない。また、細胞の性質として免疫グロブリンを分泌しない、いわゆる非分泌型の細胞株であることが好ましい。

ミエローマ細胞の具体例としては、P3X63Ag8 [ATCC TIB-9; Nature, 256, 495-497(1978)]、P3 X63 Ag8U.1(P3U1) [ATCC CRL-1580; Current Topics in Microbiology and Immunology, 81,1-7(1978)]、P3X63Ag8.653 [ATCC TIB-18; European J. Immunology, 6, 511-519(1976)]、P2/NSI/1-Ag4-1[ATCC CRL-1581; Nature, 276, 269-270(1978)]などのマウスミエローマ細胞株、210.RCY. Ag1. 2.3(Y3-Ag1.2.3)[ATCC CRL-1631; Nature, 277, 131-133(1979)]などのラットミエローマ細胞株、U-266-AR1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5429(1980)]、GM 1500 [Nature, 288, 488(1980)]、KR-4[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6651

(1982)] などのヒトミエローマ細胞株等を例示することができる。

抗体産生細胞は、脾臓細胞、リンパ節細胞、胸腺細胞、末梢血細胞などから得られる。すなわち、前記各種動物から脾臓、リンパ節、胸腺、末梢血等を摘出又は採取し、これら組織を破碎する。得られる破碎物をPBS、DMEM、RPMI1640、E-RDF等の培地又は緩衝液に懸濁し、#200～250ステンレスメッシュ等で濾過後、遠心分離を行うこと等により目的とする抗体産生細胞を調製する。

次に、上記ミエローマ細胞と抗体産生細胞とを細胞融合させる。

細胞融合にあたっては、抗体産生細胞に適したミエローマ細胞の選択を行う。細胞融合はイーグルの最少必須培地(MEM)、ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)、RPMI-1640 培地、E-RDF培地などの動物細胞培養用培地中で $10^6 \sim 10^8$ 細胞/mlのミエローマ細胞と抗体産生細胞とを、混合比1:1～10で、例えば約1:6の割合で、RPMI-1640 とジメチルスルホキシドとの混合液などの培地中で、融合促進剤存在下、30～37℃で1～15分間細胞同士を接触させることによって効率的に融合反応を進めることが出来る。細胞融合を促進させるためには、平均分子量1,000～6,000のポリエチレングリコール、ポリビニールアルコール、又はセンダイウィルスなどの融合促進剤や融合ウィルスを使用することが出来る。また、電気刺激(例えばエレクトロポレーション)を利用した市販の細胞融合装置を用いて抗体産生細胞とミエローマ細胞とを融合させることもできる。

(5) ハイブリドーマの選択及びクローニング

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。その方法として、選択培地における細胞の選択的増殖を利用する方法を用いることができる。細胞懸濁液を10～20%で、例えば15%ウシ胎児血清含有 E-RDF培地などで適当に希釈後、マイクロタイタープレート上に $10^2 \sim 10^6$ 細胞/ウェル程度まき、各ウェルに選択培地、例えば HAT培地などを加え、以後適当に選択培地を交換して培養を行う。

ミエローマ細胞として8-アザグアニン耐性株、選択培地として HAT培地を用いた場合は、未融合のミエローマ細胞は培養7日目頃には死滅し、正常細胞である抗体産生細胞もイン・ビトロでは長く生存できず、培養10日目頃には死滅する。その結果、培養約10日前後から生育してくる細胞をハイブリドーマとして得る

ことができる。

増殖してきた細胞の培養上清につき、目的とする抗脳型プロスタグランジンD合成酵素抗体産生があるか否かをスクリーニングする。ハイブリドーマのスクリーニングは通常の方法によれば良く、特に限定はされない。例えば、ハイブリドーマとして生育したウェルに含まれる培養上清の一部を採集し、固相化したプロスタグランジンD合成酵素に該上清を添加した後、標識した第二抗体を加えてインキュベートし、その結合能を酵素免疫測定法（EIA, ELISA）、RIA等によって測定することが出来る。

まず、免疫原として使用した天然型又は種々の組換え脳型プロスタグランジンD合成酵素を吸着させた96穴マイクロタイタープレートにモノクローナル抗体を含む培養上清を添加して抗原と反応させる。次いで、結合した特異抗体に酵素標識抗免疫グロブリン抗体を反応させるか、又は結合した特異抗体にビオチン標識抗免疫グロブリン抗体を反応させた後にさらにアビジン-酵素標識体を反応させる。最後に、各ウェルに酵素基質を加えて発色させる。免疫原として使用した天然型又は各種組換え脳型プロスタグランジンD合成酵素を固相化したウェルでのみ発色する培養上清を選別することにより、脳型プロスタグランジンD合成酵素に対して結合性を有する抗体を産生するハイブリドーマを検索することが出来る。

ハイブリドーマのクローニングは、限界希釈法、軟寒天法、フィブリンゲル法、蛍光励起セルソーター法等により行い、最終的にモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを取得できる。

(6) モノクローナル抗体の採取

取得したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法としては、通常の細胞培養法や腹水形成法等が採用できる。

細胞培養法においては、ハイブリドーマを10～20%仔ウシ血清含有 RPMI-1640 培地、MEM 培地又はE-RDF培地又は無血清培地等の動物細胞培養培地中で、通常の培養条件（例えば37℃、5%CO₂濃度）で2～14日間培養し、その培養上清から抗体を取得することができる。

腹水形成法においては、ミエローマ細胞由来の哺乳動物と同種の動物の腹腔内

にプリスタン (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) 等の鉱物油を投与し、その後ハイブリドーマ $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$ 個、好ましくは $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 個を腹腔内に投与し、ハイブリドーマを大量に増殖させる。そして、1～4週間、好適には2～3週間後に腹水又は血清を採集する。

上記抗体の採取方法において、抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、DEAEセルロースなどの陰イオン交換体を利用するイオン交換クロマトグラフィー、プロテインAセファロースなどを用いるアフィニティークロマトグラフィー、分子量や構造によってふるい分ける分子ふるいクロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜に選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することが可能である。

2. 本発明のモノクローナル抗体を用いた脳型プロスタグランジンD合成酵素の検出方法

本発明の検出方法は、上記モノクローナル抗体を用いて脳型プロスタグランジンD合成酵素を検出するものであり、以下の通り行うことができる。

希釈した脳脊髄液又は血液等のサンプルを96ウェルマイクロタイタープレートにコーティングし、0.2%ゼラチンPBS等でブロッキングした後、酵素標識化したモノクローナル抗体を添加し、インキュベートする。又は、ビオチン化したモノクローナル抗体を添加し、プレートを洗浄後、酵素標識化アビジン又はストレプトアビジンを添加し、さらにインキュベートする。インキュベート後プレートを洗浄し、発色基質としてABTS(2,2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))等を添加して発色させ、比色法により測定する。

または、希釈したモノクローナル抗体を96ウェルマイクロタイタープレートにコーティングし、0.2%ゼラチンPBS等でブロッキングした後、希釈した脳脊髄液又は血液等のサンプルを添加し、インキュベートする。プレートを洗浄後、酵素標識化したモノクローナル抗体或いはポリクローナル抗体を添加し、インキュベートする。又は、ビオチン化したモノクローナル抗体或いはポリクローナル抗体を添加し、プレートを洗浄後、酵素標識化アビジン又はストレプトアビジンを添加し、さらにインキュベートする。インキュベート後プレートを洗浄し、発色

基質としてABTS(2, 2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))等を添加して発色させ、比色法により測定する。このようにして、ヒトプロスタグランジンD合成酵素を検出できるとともに、酵素量を定量することができる。

3. 本発明のモノクローナル抗体を用いた脳型プロスタグランジンD合成酵素の測定用試薬

本発明のモノクローナル抗体は、脳型プロスタグランジンD合成酵素に対して特異的に結合することから、脳型プロスタグランジンD合成酵素の測定用試薬として有用である。また、本抗体は生体臓器、組織、細胞、体液中の脳型プロスタグランジンD合成酵素又は脳型プロスタグランジンD合成酵素とエпитープを共通する他の類似抗原、脳型プロスタグランジンD合成酵素の断片ペプチドなどの存在、分布を明らかにする有用な試薬であり、その存在量を測定する試薬、診断薬として価値があるものである。生体臓器、組織、細胞、体液中の脳型プロスタグランジンD合成酵素の検出及び測定は、EIA、ELISA、RIA、FIA、ウェスタンブロッティング法、免疫組織化学法等による定性的又は定量的手法に基づき実施できる。

4. 脳型プロスタグランジンD合成酵素検出用キット

上記検出法において標識剤として酵素を用いた場合、本発明のキットは、下記の構成試薬を含むものである。

- (1) 酵素標識化モノクローナル抗体
- (2) 基質溶液

また、上記キットの変形としてサンドイッチELISA法を採用すれば、本発明のキットは下記の試薬を含むものである。

- (1) モノクローナル抗体
- (2) 酵素標識化モノクローナル抗体或いはポリクローナル抗体
- (3) 基質溶液

また、上記キットの変形としてビオチン-アビジン法を採用すれば、本発明の

キットは下記の試薬を含むものである。

- (1) ビオチン化モノクローナル抗体
- (2) 酵素標識化アビジン又はストレプトアビジン
- (3) 基質溶液

また、上記キットの変形としてサンドイッチELISA法及びビオチン-アビジン法を採用すれば、本発明のキットは下記の試薬を含むものである。

- (1) モノクローナル抗体
- (2) ビオチン化モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体
- (3) 酵素標識化アビジン又はストレプトアビジン
- (4) 基質溶液

なお、上記のキットにおいて「モノクローナル抗体」とは、本発明のモノクローナル抗体をいう。また、「ポリクローナル抗体」とは、脳型プロスタグランジンD合成酵素で免疫した動物から得られる血清に含まれる抗体をいい、以下のよう調製することができる。

① 抗原の調製

先に取得され、公知の脳型プロスタグランジンD合成酵素 cDNA [Nagata et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4020-4024 (1991)] を常法に従い、大腸菌、CHO細胞等を用いて大量調製できる。すなわち、脳型プロスタグランジンD合成酵素 cDNA を含む組換え体を作製し、該組換え体によって形質転換された形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から通常の精製手法を用いることにより、脳型プロスタグランジンD合成酵素を精製することができる。

得られたプロスタグランジンD合成酵素を緩衝液に溶解し、ついでアジュバンドを添加する。アジュバントとしては、市販のフロイント完全アジュバンド、フロイントの不完全アジュバンド、BCG、ハンターズ タイターマックス (CytRx 社製)、キーホールリンベットヘモシアニン含有オイル等が挙げられ、これらの何れのものでもよい。

② 免疫及び血液の採取

上記のようにして得られた免疫原を哺乳動物、例えばウマ、サル、イヌ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、モルモット、ハムスター若しくはマウスなどの

哺乳動物、又はハト若しくはニワトリなどの鳥類に投与するが、特にマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギなどが使用上好ましい。免疫は、既存の方法であれば何れの方法をも用いることができるが、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入するのが好ましい。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、好ましくは1週間～3週間間隔で、2～10回、好ましくは2～5回免疫する。

前記「1.モノクローナル抗体の製造」の(3)項に記載された方法に従って抗体価を測定し、抗体価の上昇した動物より採血し、得られた血清を室温又は4℃で放置した後、遠心分離を行うことによりポリクローナル抗体を含む血清が得られる。

ポリクローナル抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、DEAEセルロースなどの陰イオン交換体を利用するイオン交換クロマトグラフィー、プロテインAセファロースなどを用いるアフィニティークロマトグラフィー、分子量や構造によってふるい分ける分子ふるいクロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜に選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することが可能である。

本発明では、上記脳型プロスタグランジンD合成酵素検出キットを用いて疾患を検出することができ、疾患の検出という観点からも、本発明のモノクローナル抗体及びこれを用いたキットを利用することによって乏精子症の診断を容易かつ迅速に行うことができる。

本発明のモノクローナル抗体は、脳型プロスタグランジンD合成酵素の精製にも用いることが出来る。すなわち、本発明のモノクローナル抗体をアガロース、セルロース、アクリルアミドゲルや、市販の自作用アフィニティ担体などの各種担体に常法に従ってカップリングさせた後、洗浄し、その後適当な溶媒、緩衝液で溶出させることにより、脳型プロスタグランジンD合成酵素を効率よく簡便に精製できる。

図面の簡単な説明

第1図は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図である。

第2図は、脳脊髄液及び精製プロスタグランジンD合成酵素のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン、及びウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

第3図は、N-グリカナーゼ処理した精製プロスタグランジンD合成酵素のウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

第4図は、各モノクローナル抗体のエピトープマッピングの結果を示す図である。

第5図は、プロスタグランジンD合成酵素の定量用標準曲線を示す図である（モノクローナル抗体1B7 使用）。

第6図は、プロスタグランジンD合成酵素の定量用標準曲線を示す図である（モノクローナル抗体6F5 使用）。

第7図は、プロスタグランジンD合成酵素の定量用標準曲線を示す図である（サンドイッチELISA法による／一次抗体：モノクローナル抗体1B7 使用、二次抗体：ビオチン化ポリクローナル抗体使用）。

第8図は、プロスタグランジンD合成酵素の定量用標準曲線を示す図である（サンドイッチELISA法による／一次抗体：モノクローナル抗体6F5 使用、二次抗体：ビオチン化ポリクローナル抗体使用）。

第9図は、プロスタグランジンD合成酵素の定量用標準曲線を示す図である（サンドイッチELISA法による／一次抗体：モノクローナル抗体1B7 使用、二次抗体：ビオチン化ポリクローナル抗体（A），ビオチン化7F5（B），ビオチン化10A3（C）使用）。

第10図は、プロスタグランジンD合成酵素の定量用標準曲線を示す図である（サンドイッチELISA法による／一次抗体：モノクローナル抗体10A3使用、二次抗体：ビオチン化ポリクローナル抗体（A），ビオチン化1B7（B）使用）。

第11図は、プロスタグランジンD合成酵素の定量用標準曲線を示す図である（サンドイッチELISA法による／一次抗体：モノクローナル抗体7F5 使用、二次抗体：ビオチン化ポリクローナル抗体（A），ビオチン化1B7（B）使用）。

第12図は、標準曲線とサンプルの希釈曲線を示す図である。

第13図は、ウェスタンブロッティングの結果を示す図である。

第14図は、プロスタグランジンD合成酵素を測定した結果を示す図である。

第15図は、モノクローナル抗体を用いて精製したプロスタグランジンD合成酵素のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果を示す図である。

発明を実施するための最良の方法

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕 モノクローナル抗体の製造

(1) 抗原の調製

抗原である脳型プロスタグランジンD合成酵素については、遺伝子工学的手法を用いて調製した。

抗原の大腸菌での発現と精製にはGST遺伝子融合システム（ファルマシア社製）を使用した。脳型プロスタグランジンD合成酵素をGSTタンパク質と融合させるために以下の操作を行った。

脳型プロスタグランジンD合成酵素cDNAのタンパク質N末端領域をコードする部分をPCRで増幅して185bpの産物を得た。

このとき用いたプライマーの塩基配列を以下に記す。

Ec23ALA：配列番号1

78NMUTA：配列番号2

PCRは、TaqDNAポリメラーゼ（宝酒造社製）、制限酵素 EcoRI、XhoI、T4DNAリガーゼ（以上宝酒造社製）を用い、PCR条件 94℃で5秒間、45℃で3秒間、72℃で5秒間を1サイクルとしてこれを28サイクル行った。

これらのプライマーを用いたPCRにより、アミノ酸配列上ではシグナル配列を除いた成熟タンパク質のN末端のアラニンから81番目のセリンまでの領域が、塩基配列上では152番目のグアニン（G）から327番目のシトシン（C）までが増幅され、5'-末端に EcoRIサイトが導入される。この間には、238番目の XhoIサイトが存在するので、PCR産物を EcoRI-XhoI 消化してサブクローニング後、もとの脳型プロスタグランジンD合成酵素cDNA [Nagata et al., Pro

c. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4020-4024 (1991)] のN-末端領域と置換した。
GST融合タンパク質のベクターはpGEX-2T (ファルマシア社製) を選び、EcoRI サイトに挿入した。

または、脳型プロスタグランジンD合成酵素cDNAの成熟タンパク質全領域をコードする部分をPCRで増幅して521bpの産物を得た。

この時用いたプライマーの塩基配列を以下に示す。

forward primer: 配列番号3

reverse primer: 配列番号4

PCRは、TaqDNAポリメラーゼ(宝酒造社製)を用い、PCR条件 94℃で5秒間、45℃で3秒間、72℃で5秒間を1サイクルとしてこれを28サイクル行った。

これらのプライマーを用いたPCRにより、アミノ酸配列上ではシグナル配列を除いた成熟タンパク質のN末端のアラニンからC末端のグルタミンまでの領域が、塩基配列上では152番目のグアニン(G)から656番目のアデニン(A)までが増幅され、5'-末端にBamHIサイトが導入され、3'-末端にEcoRIサイトが導入される。増幅されたDNAを、GST融合タンパク質のベクターであるpGEX-2T (ファルマシア社製) のEcoRI/BamHI サイトに挿入した。

その結果、GST-プロスタグランジンD合成酵素融合タンパク質発現ベクターが得られた。これを常法に従ってIPTG誘導型大腸菌DH5 α 又はJM109を形質転換し、ファルマシア社のプロトコールに従って、生産された融合タンパク質をグルタチオン固定化ビーズアフィニティーカラムクロマトグラフィーにより選択的に回収後、トロンビン処理することによって組換え型プロスタグランジンD合成酵素を回収した。最終的に100 mlの培養から約2 mgの脳型プロスタグランジンD合成酵素を得た。

2種類の独立のクローン由来の菌体(E. coli DH5 α /pGDS2及びE. coli DH5 α /pGDS7)より調製したサンプルの10~20%グラディエントゲルでSDS-PAGEを行った結果を示す(第1図)。

レーン1は分子量マーカー、レーン2~5と6~9がそれぞれ同一クローン由来のサンプルである。レーン2及び6、レーン3及び7、レーン4及び8並びに

レーン 5 及び 9 は、それぞれ、菌体破砕物、アフィニティーカラム非吸着画分、トロンビン処理後の溶出画分、還元型グルタチオンでの溶出画分のバンドを示す。レーン 2 及び 6 で分子量 45kDa 付近に見られるバンドは融合タンパク質であり、GST 非吸着画分（レーン 3 及び 7）ではバンドはほとんど認められない。グルタチオンでの溶出画分（レーン 5 及び 9）では同じ位置にトロンビン処理で切れ残った融合タンパク質のバンドと GST のバンド（分子量約 25kDa）が認められる。

SDS-PAGE の結果から、E. coli 中では分子量約 45kDa GST-プロスタグランジン D 合成酵素融合タンパク質の形で存在し、トロンビン処理によって分子量約 20kDa のタンパク質が溶出され（レーン 4 および 8）、遺伝子側から推察したプロスタグランジン D 合成酵素の分子量 20kDa にほぼ一致することから、本タンパク質がプロスタグランジン D 合成酵素タンパク質であることが分かる。

(2) 抗体産生細胞の調製

フロイントの完全アジュバンド 0.5ml に前記(1)で調製した脳型プロスタグランジン D 合成酵素 500 μ g 相当を含む 500 μ l の溶液を混合し、3～5 分間エマルジョン化を行った。このエマルジョン 100 μ l をマウス (BALB/c) の尾部基底の皮下に注入した。更に、初回免疫から 3 週間後に同様にしてフロイントの不完全アジュバンドとのエマルジョンとして調製した抗原溶液を、同量腹腔内に注入して追加免疫を行った。更に、追加免疫から 3 週間後に、100 μ g/200 μ l となるよう PBS に溶解した抗原をマウス一匹あたり 100 μ g になるように尾静脈に注入した。最終免疫 3 日後にマウスから脾臓を摘出し、E-RDF 培地中で破碎することにより浮遊細胞を得た。

(3) 細胞融合

この脾臓浮遊細胞 1×10^8 個と、マウスミエローマ P3-X63-Ag8-U1 (P3-U1) 株 1×10^7 個、又は P3-X-63-Ag8.653 株 1×10^7 個とを 50% (W/V) PEG (分子量 1,500、Boehringer Mannheim 社製) 中で Oi 及び Herzenberg の方法 [Selected Methods in Cellular Immunology, 351-371, W. H. Freeman & Co., USA press, 1980] に従って融合させた。

(4) ハイブリドーマの選択

ハイブリドーマの選択は、HAT 培地 [ヒポキサンチン1.36mg/dl、アミノプテリン19.1 μ g/dl、チミジン387 μ g/dl、およびウシ胎児血清10%及びOrigenHCF(IGEN社製)5%を含むE-RDF 培地] を用いて前記0iらの方法に従って行った。

(5) モノクローナル抗体の選択

得られた特異抗体陽性ウェル15個を限界希釈法を最低2回繰り返すことによりクローン化した。得られた6個のクローンを以下に示す方法で培養することにより、脳型プロスタグランジンD合成酵素に特異的に反応するモノクローナル抗体を著量生産する株を得た。

すなわち、 1×10^7 個のハイブリドーマ細胞を、ウシ胎児血清10%を含む E-RDF培地50mlを用いて、225cm²のフラスコ内で5%CO₂の存在下、37℃で4日間培養した。得られた細胞株6株の内の5株をピックアップした。第1表にこれらをまとめる。

第1表

抗原	全ウェル数	細胞増殖ウェル数	特異抗体陽性ウェル数	特異抗体確立ウェル数
ヒト脳型 プロスタグランジン D合成酵素	960	778	15	6

第1表中、「細胞増殖ウェル数」とはHAT培地を用いた選択培養によりハイブリドーマの増殖が見られたウェル数、「特異抗体陽性ウェル数」とは実施例1(1)で調製した抗原を用いたELISA法により特異抗体産生が見られたウェル数、「特異抗体確立ウェル数」とはクローニングにより特異抗体産生ハイブリドーマの確立を行ったウェル数を意味する。なお、ピックアップした5株の細胞株を1B7、6F5、7F5、9A6、10A3と命名し、それぞれの細胞株が生産するモノクローナル抗体をそれぞれ同様の名称とした。なお、上記細胞株(1B7、6F5、7F5、9A6、10A3)は、工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、1B7についてはFERM BP-5709(原寄託日平成7年9月21日)、6F5についてはFERM BP-5710(原寄託日平成7年9月21日)、7F5についてはFERM BP-5711(原寄託日平成8年6月6日)、9A6についてはFERM BP-5712(原寄託日平成8年6月6日)、10A3についてはFERM BP-5713(原寄託日平成8年6月

6日)として寄託されている。

(6) モノクローナル抗体の製造

上記(5)でピックアップした細胞株1B7、6F5、7F5、9A6、10A3をマウスの腹腔内に投与した。また6B9に関してもマウスの腹腔内に投与した。すなわち、マウス腹腔内にプリスタン1.0mlを注射し、その後2週間目の腹腔に 1×10^6 個のハイブリドーマ細胞を移植し、2週間後に腹水を採取した。

得られた腹水を、常法に従ってプロテインAアフィニティーカラムクロマトグラフィー操作にかけた。

その結果、脳型プロスタグランジンD合成酵素モノクローナル抗体を3~10mg/ml得た。

モノクローナル抗体イソタイピングキット(アマシャム社製、RPN29)を用いて1B7、6F5のタイピングを行ったところ、共にサブクラスがIgG1であり、軽鎖が λ であることが判明した。

〔実施例2〕 モノクローナル抗体の性質

(1) ELISA法による特異性の検討

96ウェルマイクロタイタープレートに各種調製した脳型プロスタグランジンD合成酵素をコートし、0.2%ゼラチンPBSでブロックした後、実施例1(5)で得られた6種の抗体液50 μ lを反応させ、通常のELISAを用いてモノクローナル抗体の特異性を検討した。その結果を第2表に示す。

第2表

	1B7	6B9	6F5	7F5	9A6	10A3
E. coli抗原	○	○	○	○	○	○
E. coliライセート	×	×	×	×	×	×
CHO抗原	○	○	○	○	×	○
CSF抗原	○	○	○	×	×	×

(○: 反応性が確認されたもの ×: 反応性が見られなかったもの)
 E. coli 抗原: E. coli で発現させ、アフィニティー精製を行ったもの。
 E. coli ライセート: プロスタグランジンD合成酵素遺伝子を挿入していないベクターをもつE. coli のライセート(陰性対照)。
 CHO 抗原: CHO 細胞で発現させ、通常の精製法で精製したもの。
 CSF 抗原: ヒト脳脊髄液より、通常の精製法で精製したもの。

第2表の結果より、少なくとも1B7、6B9、6F5に関しては、脳型プロスタグランジンD合成酵素本体を特異的に認識しているものと考えられた。

(2) ウェスタンブロッティングによる特異性の検討

上記各種抗原を16%均一ゲルを用いたSDS-PAGEに供したものについて、5種の抗体でウェスタンブロッティングを行った。結果を第3表に示す。

第3表

	1B7	6B9	6F5	9A6	10A3
E. coli抗原	○	○	○	○	○
E. coliライセート	×	×	×	×	×
CHO抗原	○	○	○	×	○

(○: 反応性が確認されたもの ×: 反応性が見られなかったもの)

シグナル(シグナルとは、ウェスタンブロッティングの発色反応によって得られるイムノブロット像)は何れもプロスタグランジンD合成酵素の分子量(約20~30kD)と等しい位置に検出され、プロスタグランジンD合成酵素に特異的なものであると考えられた。

次いでCSF抗原及び脳脊髄液そのものを用いたウェスタンブロッティングの結果を第2図に示す。

レーンAは脳脊髄液で、各レーンとも2 μ lずつアプライした。レーンBは脳脊髄液より精製したプロスタグランジンD合成酵素(CSF抗原)で、各レーンとも50ngずつアプライした。銀染色により全タンパク質を染色したところ(Silver stain)、脳脊髄液中には多数のタンパク質が認められ、精製プロスタグランジンD合成酵素は分子量約27kDのブロードなバンドとして認められる。

各モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、全てのモノクローナル抗体(1B7, 6B9, 6F5, 7F5, 9A6, 10A3)は精製プロスタグランジンD合成酵素(レーンB)と等しい位置(約27kD)の単一タンパクとのみ反応性を示す(レーンA)ことが明らかとなり、これらの抗体が脳脊髄液中の他の夾雑物と反応することなく特異的にプロスタグランジンD合成酵素を認識していることが判明した。

また、精製プロスタグランジンD合成酵素をN-グリカナーゼで処理した後、ウェスタンブロッティングに供した。結果を第3図に示す。レーンAはグリカナーゼ処理後、レーンBはグリカナーゼ処理前のサンプルを用いたものである。このように、1B7、6B9、6F5、7F5、10A3ではグリカナーゼ処理前・処理後のバンドの濃さに大きな変化が生じなかったが、9A6ではグリカナーゼ処理後にバンドが非常に濃くなり、9A6は糖鎖結合領域又はその付近を認識しているものと考えられた。

次いで、マウスモノクローナル抗体タイピングキット（アマシャム社製、RPN-29）を用いて、各モノクローナル抗体のアイソタイプを決定した。結果を第4表に示す。さらに、Friguet らの方法(Friguet et al., J. Immunol. Methods, 77, 305-319, 1985)を用いてE. coli抗原及びCSF 抗原に対するKd値を測定した。結果を第4表に示す。

第4表

モノクローナル 抗体	イムノグロブリン サブクラス	解離 定数 (nM)	
		E. coli 抗原	CSF 抗原
1B7	IgG1 (λ)	5.4	3.9
6B9	IgG1 (κ)	>1000	>1000
6F5	IgG1 (λ)	13.2	10.3
7F5	IgG1 (κ)	0.65	4.1
9A6	IgG2a (κ)	7.42	>1000
10A3	IgG1 (κ)	0.53	3.9

このように1B7、6F5、7F5、10A3はE. coli抗原及びCSF 抗原と高い親和性を示し、これらのモノクローナル抗体が、未変性状態のプロスタグランジンD合成酵素分子表面を認識していることが明らかとなった。9A6はE. coli抗原とは高い親和性を示したが、CSF 抗原とは殆ど反応性を示さず、第3図の結果も併せ、糖鎖結合部位付近を認識している可能性が高いものと考えられた。6B9は第2図の結果からウェスタンブロッティングでは反応性を示したものの、今回はE. coli抗

原及びCSF 抗原に殆ど反応性を示さず、変性状態のプロスタグランジンD合成酵素分子を認識しているものと考えられた。

次いで、PCR 法によりプロスタグランジンD合成酵素のN-末端アミノ酸を順次削除した変異体を作製し、それらを抗原として各モノクローナル抗体のエピトープマッピングを行った。本実験で用いたPCR プライマーの塩基配列を以下に、結果を第4図に示す。尚、本実験で用いた抗原は基本的に〔実施例1(1)〕に記した方法に従って調製したが、トロンビンによる回収の代わりに1%SDS中でボイルすることにより、GST-融合タンパクの形で回収した。

forward primer A (アミノ酸番号1-7)	: 配列番号 3
forward primer B (アミノ酸番号7-12)	: 配列番号 5
forward primer C (アミノ酸番号13-18)	: 配列番号 6
forward primer D (アミノ酸番号30-35)	: 配列番号 7
forward primer E (アミノ酸番号52-57)	: 配列番号 8
forward primer F (アミノ酸番号68-73)	: 配列番号 9
forward primer G (アミノ酸番号85-90)	: 配列番号 10
forward primer H (アミノ酸番号99-105)	: 配列番号 11
forward primer I (アミノ酸番号118-123)	: 配列番号 12
forward primer J (アミノ酸番号134-139)	: 配列番号 13
forward primer K (アミノ酸番号152-158)	: 配列番号 14
reverse primer (アミノ酸番号163-168)	: 配列番号 4

第4図より、7F5 及び10A3はAla¹-Val⁶、9A6 はGln¹³-Asn²⁹、6F5 はTy^{r85}-Val⁹⁸、1B7 及び6B9 はGly¹¹⁸-Pro¹³³中の配列を認識しているものと考えられた。

(3) 標準曲線の作製

上記E. coli抗原を用いて、プロスタグランジンD合成酵素を定量するための標準曲線を作製した。モノクローナル抗体は、1B7、及び6F5を用いた。はじめに希釈したE. coli抗原を96ウェルマイクロタイタープレートにコーティングし、0.2%ゼラチンPBSでブロッキングした後、ビオチン化したモノクローナル抗体1B7、6F5を添加し、インキュベートした。洗浄後、ストレプトアビジン-西洋ワサ

ビペルオキシダーゼコンジュゲートを添加し、インキュベートした。洗浄後、発色基質としてABTS(2, 2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))を用いてヒトプロスタグランジンD合成酵素量を比色法により測定した。1B7については第5図、6F5については第6図に結果を示す。

次いで、サンドイッチELISA法による標準曲線の作製を行った。希釈したモノクローナル抗体1B7、又は6F5を96ウェルマイクロタイタープレートにコーティングし、0.2%ゼラチンPBSでブロッキングした後、希釈したE. coli抗原を添加し、インキュベートした。洗浄後、ビオチン化したポリクローナル抗体を添加し、インキュベートした。洗浄後、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートを添加し、インキュベートした。洗浄後、発色基質としてABTS(2, 2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))を用いてヒトプロスタグランジンD合成酵素量を比色法により測定した。1B7については第7図、6F5については第8図に結果を示す。第5～8図より、サンドイッチELISA法を用いた方が約10倍感度が高くなることが明らかとなった。

更に、ビオチン化ポリクローナル抗体、又はビオチン化モノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法による標準曲線の作製を行った。希釈したモノクローナル抗体1B7、又は10A3、又は7F5を一次抗体として96ウェルマイクロタイタープレートにコーティングし、0.2%ゼラチンPBSでブロッキングした後、希釈したE. coli抗原を添加し、インキュベートした。洗浄後、ビオチン化したポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体1B7若しくは7F5若しくは10A3を2次抗体として添加し、インキュベートした。洗浄後、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートを添加し、インキュベートした。洗浄後、発色基質としてABTS(2, 2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))を用いてヒトプロスタグランジンD合成酵素量を比色法により測定した。

第9～11図に結果を示す。

第9図は1次抗体にモノクローナル抗体1B7を用いた場合の結果で、曲線Aは2次抗体にビオチン化ポリクローナル抗体を用いたもの、曲線Bは2次抗体にビオチン化7F5を用いたもの、曲線Cは2次抗体にビオチン化10A3を用いたものである。

第10図は1次抗体にモノクローナル抗体10A3を用いた場合の結果で、曲線Aは2次抗体にビオチン化ポリクローナル抗体を用いたもの、曲線Bは2次抗体にビオチン化1B7を用いたものである。

第11図は1次抗体にモノクローナル抗体7F5を用いた場合の結果で、曲線Aは2次抗体にビオチン化ポリクローナル抗体を用いたもの、曲線Bは2次抗体にビオチン化1B7を用いたものである。

第9～11図より、1次抗体に10A3又は7F5を用い、2次抗体にビオチン化ポリクローナル抗体を用いるか、又はモノクローナル抗体を用いる場合にはビオチン化1B7を用いた場合、高い感度を得られることが判明した。

〔実施例3〕ヒトプロスタグランジンD合成酵素の検出

(1) 脳脊髄液中のヒトプロスタグランジンD合成酵素の検出

希釈したモノクローナル抗体1B7、6F5を96ウェルマイクロタイタープレートにコーティングし、0.2%ゼラチンPBSでブロッキングした後、希釈した脳脊髄液を添加し、インキュベートした。一方、免疫動物としてウサギを用いて作製したポリクローナル抗体をプロテインAアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製し、NHS-LC-Biotin化キット(PIERCE社製)を用いてビオチン化した。

次に、前記インキュベートの後のマイクロタイタープレートを洗浄後、ビオチン化したポリクローナル抗体を添加し、インキュベートした。洗浄後、ストربتアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲートを添加し、インキュベートした。洗浄後、発色基質としてABTS(2,2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンゾチアゾリン-6-スルホン酸))を用いてヒトプロスタグランジンD合成酵素量を比色法により測定した。結果を第5表に示す。

第5表

検体1	検体2	検体3	検体4	検体5
23	31	20	10	18

(単位: $\mu\text{g/ml}$)

(2) 血液中のヒトプロスタグランジンD合成酵素の検出

希釈したヒト血清を用いて上記(1)と同様の手法によりヒトプロスタグランジンD合成酵素量を測定した。結果を第6表に示す。

第6表

検体1	検体2	検体3	検体4	検体5
0.45	0.29	0.21	0.41	0.26

(単位: $\mu\text{g/ml}$)

(3) 羊水中のヒトプロスタグランジンD合成酵素の検出

希釈したヒト羊水を用いて上記(1)と同様の手法によりヒトプロスタグランジンD合成酵素量を測定した。結果を第7表に示す。

第7表

検体1	検体2	検体3	検体4	検体5
5.5	1.2	1.3	2.9	1.8

(単位: $\mu\text{g/ml}$)

(4) 精漿中のヒトプロスタグランジンD合成酵素の検出

希釈したヒト精漿を用いて上記(1)と同様の手法によりヒトプロスタグランジンD合成酵素量を測定した。結果を第8表に示す。

第8表

検体1	検体2	検体3	検体4	検体5
4.1	12	23	10	8.3

(単位: $\mu\text{g/ml}$)

(5) 卵胞液中のヒトプロスタグランジンD合成酵素の検出

希釈したヒト卵胞液を用いて上記(1)と同様の手法によりヒトプロスタグランジンD合成酵素量を測定した。結果を第9表に示す。

第9表

検体1	検体2	検体3	検体4	検体5
0.21	0.11	0.11	0.15	0.13

(単位: $\mu\text{g/ml}$)

(6) 尿中のヒトプロスタグランジンD合成酵素の検出

希釈したヒト尿を用いて上記(1)と同様の手法によりヒトプロスタグランジンD合成酵素量を測定した。結果を第10表に示す。

第10表

検体1	検体2	検体3	検体4	検体5
1.07	0.65	2.45	1.62	0.32

(単位: $\mu\text{g/ml}$)

(7) 各種体液中のヒトプロスタグランジンD合成酵素の検出

次に、実施例2(3)で作製したサンドイッチELISAの系(7F5モノクローナル抗体×ビオチン化1B7モノクローナル抗体)を用いて、ヒト脳脊髄液、血清、尿中のヒトプロスタグランジンD合成酵素量を測定し、これらの平均値(±SE)と過去に論文報告されている値を比較した。尚、今回は発色基質としてABTSの代わりにTMBLUE基質溶液(Intergen-CDP社製)を用いた。

今回の測定値の平均を第11表、Aに、論文値を第11表、Bに示す。また、ヒト羊水、精漿を用いて同様の手法によりヒトプロスタグランジンD合成酵素量を測定した平均値(±SE)も第11表、Aに示す。

第 1 1 表

A.

サンプル名	サンプル数	測定値平均(±SE)(μ g/ml)
脳脊髄液	38	12.07 ± 1.26
血清	12	0.27 ± 0.01
尿	10	1.56 ± 0.30*
羊水	52	2.55 ± 0.22
精漿	32	13.01 ± 1.72

* 24時間当たりの排泄量(mg)

B.

サンプル名称	サンプル数	測定値平均(±SD)(μ g/ml)	文献名
脳脊髄液	12	40	Pepe, A. J. and Hochwald, G. M. (1967) Proc. Soc. Exp. Biol. 126, 630-633
脳脊髄液	59	26(±6)	Link, H. and Olsson, J. E. (1972) Acta Neurol. Scandinav. 48, 57-68
脳脊髄液	35	27(±1.5)	Olsson, J. E., Link, H., and Müller, R. (1976) J. Neurol. Sci. 27, 233-245
脳脊髄液	192	33(±11)	Felgenhauer, K., Schädlich, H. J., and Nekić, M. (1987) Klin. Wochenschr. 65, 764-768
血清	25	3.9(±0.16)	Olsson, J. E., Link, H., and Nosslin, B. (1973) J. Neurochem. 21, 1153-1159
尿	15	3.6~53.9*	Whitsed, H. and Penny, R. (1974) Clin. Chim. Acta 50, 119-128

* 平均値ではなく範囲、24時間当たりの排泄量(mg)

このように、今回の測定値はいずれも論文値より低く、特に夾雑物質が多いと考えられる血清ではそれが顕著であった。これは過去に用いた方法の特異性が低かったためにプロスタグランジンD合成酵素が過剰に測定されていたことが原因であると考えられ、本測定系の特異性の高さが明らかとなった。

次いで、これらの測定の際に作製した典型的な希釈曲線を第12図に示す。

曲線Aは、標準物質としてヒト脳脊髄液より精製したプロスタグランジンD合成酵素または実施例1(1)で調製した組換えヒトプロスタグランジンD合成酵素を用いた標準曲線である。曲線B、C、D、E、Fは、各々脳脊髄液、精漿、尿、羊水、血清を用いたサンプル希釈曲線である。このように、各試料の希釈曲線は標準曲線とほぼ平行であり、本測定系を用いることによって試料中の夾雑物の影響を受けることなくヒトプロスタグランジンD合成酵素が特異的に測定できることが明らかとなった。

次いで、本測定系における添加回収試験を行った。ヒト脳脊髄液、血液、尿、精漿をプロスタグランジンD合成酵素濃度が20ng/ml 前後になるよう希釈し、ここに15ng/ml の精製プロスタグランジンD合成酵素を添加した。その結果、第12表に示したように、全てのサンプルにおいて良好な回収率(98.5 ~104.6%) が得られた。

第 1 2 表

サンプル	希釈率 (-倍)	プロスタグランジンD合成酵素 (ng/ml) はじめの濃度	添加量	回収	回収率 (%)
脳脊髄液 1	350	20.69	15.00	35.65	99.7
脳脊髄液 2	600	21.17	15.00	36.31	100.9
血清 1	15	20.71	15.00	36.21	103.3
血清 2	15	18.67	15.00	33.96	101.9
尿 1	40	20.86	15.00	36.55	104.6
尿 2	40	18.56	15.00	33.34	98.5
精漿 1	500	16.82	15.00	31.70	99.2
精漿 2	1000	19.51	15.00	34.93	102.8

〔実施例 4〕

次に、1B7モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティング法により、5名分の検体(精漿)中のプロスタグランジンD合成酵素の検出を行った。その結果を第13図に示す。第13図に示すとおり、プロスタグランジンD合成酵素が特異的に検出され、本モノクローナル抗体が精漿中の他の夾雑物と反応することなくプロスタグランジンD合成酵素とのみ反応性を示すことが明らかとなった。

次に、実施例2で作製したサンドイッチELISAの系(1B7モノクローナル抗体×ビオチン化ポリクローナル抗体)を用いて、健常人(40例、Normal)及び乏精子症(10例、Oligospermia)の精漿1ml当たりのプロスタグランジンD合成酵素量を測定した。なお、精子数は、マクラーの精子計数盤を用いた検鏡により測定した数字である。結果を第13表に示す。

第13表

検体番号	精子数 ($\times 10^4$ 個/ml)	対 象	ELISA による PGDS量 ($\mu\text{g/ml}$)
1	0	乏精子症患者	2.6
2	100	乏精子症患者	0.8
3	100	乏精子症患者	1.0
4	800	乏精子症患者	3.8
5	800	乏精子症患者	2.2
6	1000	乏精子症患者	0.9
7	1800	乏精子症患者	1.0
8	2000	乏精子症患者	5.0
9	2000	乏精子症患者	4.8
10	2000	乏精子症患者	2.6
11	2500	健 常 人	4.3
12	3000	健 常 人	7.5
13	3000	健 常 人	23.6
14	3000	健 常 人	30.0
15	3000	健 常 人	9.5
16	3000	健 常 人	2.5
17	3000	健 常 人	4.4
18	4000	健 常 人	6.0
19	4000	健 常 人	30.0
20	4200	健 常 人	8.0
21	5000	健 常 人	1.9
22	6000	健 常 人	42.0
23	6000	健 常 人	1.5
24	6000	健 常 人	3.8
25	6500	健 常 人	2.0
26	7000	健 常 人	3.2
27	7000	健 常 人	8.2
28	8000	健 常 人	9.6
29	8000	健 常 人	14.0
30	8500	健 常 人	6.0
31	8800	健 常 人	3.0
32	9000	健 常 人	8.0
33	9000	健 常 人	7.1
34	10000	健 常 人	10.1
35	10000	健 常 人	3.0
36	10000	健 常 人	7.5
37	10000	健 常 人	6.0
38	11000	健 常 人	0.3
39	12000	健 常 人	17.0
40	12000	健 常 人	2.6
41	12000	健 常 人	7.0
42	12000	健 常 人	1.1
43	13000	健 常 人	10.5
44	13900	健 常 人	30.0
45	15000	健 常 人	16.0
46	15000	健 常 人	5.1
47	15000	健 常 人	3.5
48	16000	健 常 人	13.0
49	17400	健 常 人	15.0
50	18000	健 常 人	6.2

プロスタグランジンD合成酵素量の平均値を算出した結果、健常人では $9.75 \pm 1.486 \mu\text{g/ml}$ 、乏精子症患者では $2.470 \pm 0.509 \mu\text{g/ml}$ であり、両者に有意な差が見られた(危険率 $P=0.0008$ (Mann-Whitney法)、 $P=0.0192$ (Fisher法); 第14図)。本キットを用いることにより大量のサンプルを一度に処理することができるため、本キットが乏精子症の診断に有用であることが明らかとなった。

〔実施例5〕

Affi-Gel Hz immunoaffinity kit (Bio-Rad 社製) を用いて、1B7, 6F5, 7F5, 9A6, 10A3の各モノクローナル抗体を担体にカップリングし、CSF からプロスタグランジンD合成酵素の1ステップ精製を試みた。

はじめにモノクローナル抗体をカップリングしたゲル10mlをPBS で平衡化しておき、ここにPBS で3 倍以上に希釈したCSF (原液10ml) をアプライした。2M NaCl を含むPBS20ml 及び0.1% Triton X-100 を含むPBS30ml で洗浄後、50mlのPBS で洗浄し、0.1Mクエン酸ナトリウム(pH3.0) で溶出を行った。その結果、いずれの抗体を用いた場合でもプロスタグランジンD合成酵素が効率的にゲルに吸着し、0.1Mクエン酸ナトリウム(pH3.0)を用いた溶出によりSDS-PAGE的にほぼ均一な標品が酵素活性を有した状態で得られた。回収率は約80% で、原液(CSF) に対し約37倍純化であった。

精製の一例を第15図示す。

産業上の利用可能性

本発明によれば、脳型プロスタグランジンD合成酵素に特異的なモノクローナル抗体が提供される。

脳型プロスタグランジンD合成酵素の中枢系における分布を解析することは、中枢系疾患を検出できる点で有用であるばかりでなく、他の中枢系に異常がある疾病に関しても脳脊髄液や体液中の脳型プロスタグランジンD合成酵素の増減を指標とすることで、かかる疾病の早期診断や予後観察等を行うことができる。また、 β -トレースおよび脳型プロスタグランジンD合成酵素は、精液や卵管液、羊水などの生殖器関連体液にも分布することから、生殖能力の判定や、胎児の発

育診断などの利用も考えられてきた。また最近、我々の研究により脳型プロスタグランジンD合成酵素遺伝子が心臓でも発現していることが明らかとなり、血液やその他体液中の脳型プロスタグランジンD合成酵素の分布や増減を調べることで循環器系疾患の診断等を行うこともできる。

従って、本発明により提供される脳型プロスタグランジンD合成酵素に特異的なモノクローナル抗体は、脳型プロスタグランジンD合成酵素の発現、組織分布、生理作用等の研究用試薬として、又は中枢系、生殖系、循環器系における各種疾患の病理診断用試薬として有用である。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

GGGAATTCAT GCACCCGAGG CC

配列番号 : 2

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

GAGGTCAGGG CGAAGCCACC

配列番号 : 3

配列の長さ : 29

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

CCGGATCCGC ACCCGAGGCC CAGGTCTCC

配列番号 : 4

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

ATGAATTCAC TATTGTTCCG TCATGCACTT

配列番号：5

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CCGGATCCTC CGTGCAGCCC AACTTC

配列番号：6

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CCGGATCCCA GCCGGACAAG TTCCTG

配列番号：7

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CCGGATCCTC GAGCTGGCTC CAGGAG

配列番号：8

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CCGGATCCGA TGCTGGCTTC AACCTG

配列番号：9

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CCGGATCCGA GACCCGAACC ATGCTG

配列番号：10

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CCGGATCCTA CCGGAGTCCC CACTG

配列番号：11

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CCGGATCCGT GGAGACTGAC TACGACC

配列番号：12

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CCGGATCCGG CGAGGACTTC CGCATG

配列番号：13

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CCGGATCCAG GGCTGAGTTA AAGGAG

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 2 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

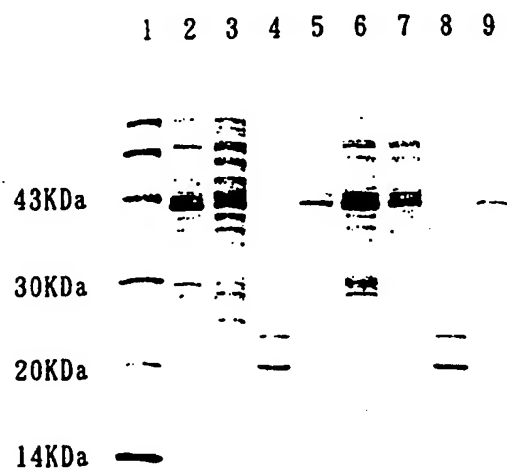
配列 :

CCGGATCCGA GGATTCCATT GTCTTCCTG

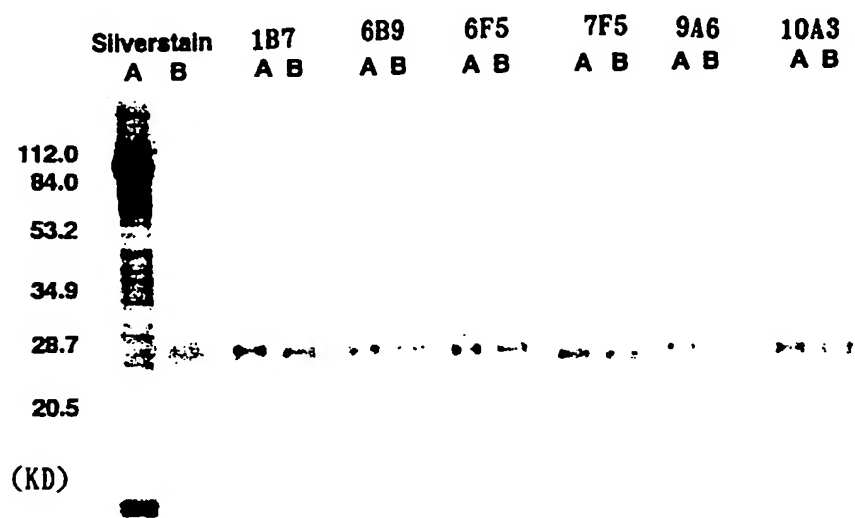
請 求 の 範 囲

1. 脳型プロスタグランジンD合成酵素を特異的に認識するモノクローナル抗体。
2. モノクローナル抗体のサブクラスが免疫グロブリンG 1又はG 2である請求項1記載のモノクローナル抗体。
3. 脳型プロスタグランジンD合成酵素で免疫した動物から得られる抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合により得られ、請求項1又は2記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。
4. 請求項1又は2記載のモノクローナル抗体を用いて脳型プロスタグランジンD合成酵素を検出することを特徴とする脳型プロスタグランジンD合成酵素の検出方法。
5. 請求項1又は2記載のモノクローナル抗体を用いて脳型プロスタグランジンD合成酵素を検出することを特徴とする疾患の検出方法。
6. 疾患が乏精子症である請求項5記載の検出方法。
7. 請求項1又は2記載のモノクローナル抗体を酵素標識したモノクローナル抗体及び基質溶液を含む試薬、請求項1又は2記載のモノクローナル抗体、酵素標識した該モノクローナル抗体又はヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素を認識するポリクローナル抗体及び基質溶液を含む試薬、請求項1又は2記載のモノクローナル抗体をビオチン化したモノクローナル抗体、酵素標識化アビジン又はストレプトアビジン及び基質溶液を含む試薬並びに請求項1又は2記載のモノクローナル抗体、ビオチン化した該モノクローナル抗体又はヒト脳型プロスタグランジンD合成酵素を認識するポリクローナル抗体、酵素標識化アビジン又はストレプトアビジン及び基質溶液を含む試薬からなる群から選ばれる脳型プロスタグランジンD合成酵素検出キット。
8. 請求項7記載の脳型プロスタグランジンD合成酵素検出キットを用いて疾患を検出することを特徴とする疾患の検出方法。
9. 疾患が乏精子症である請求項8記載の検出方法。

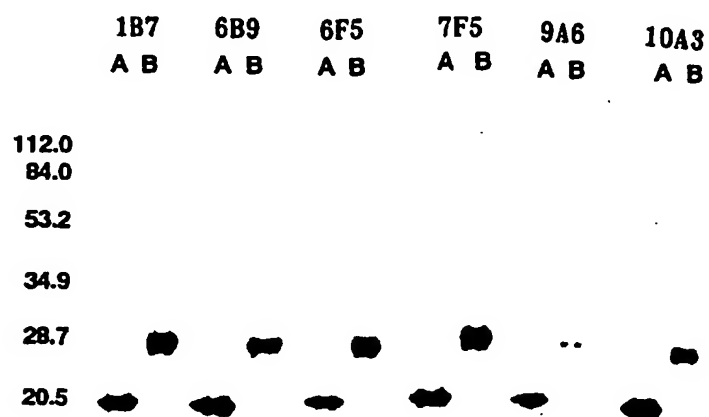
第 1 図



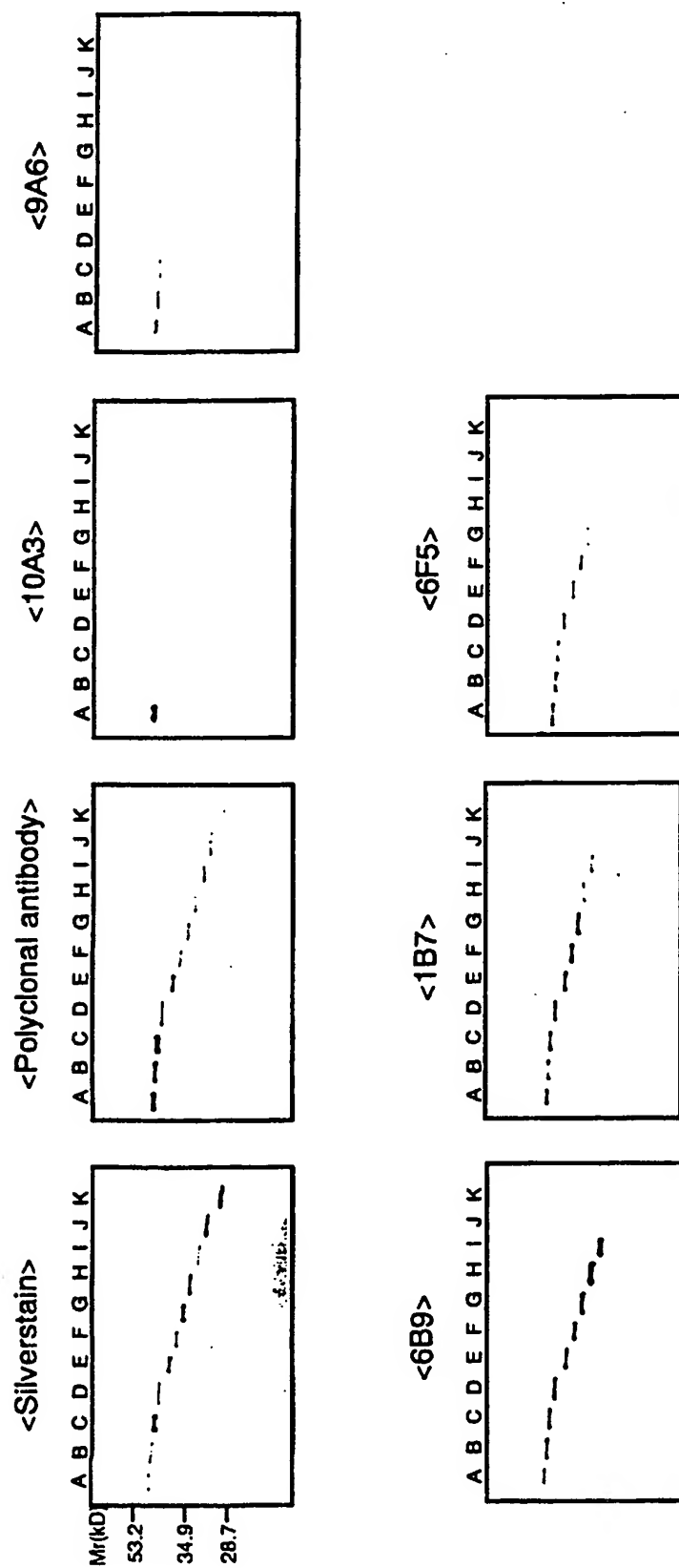
第 2 図



第 3 図

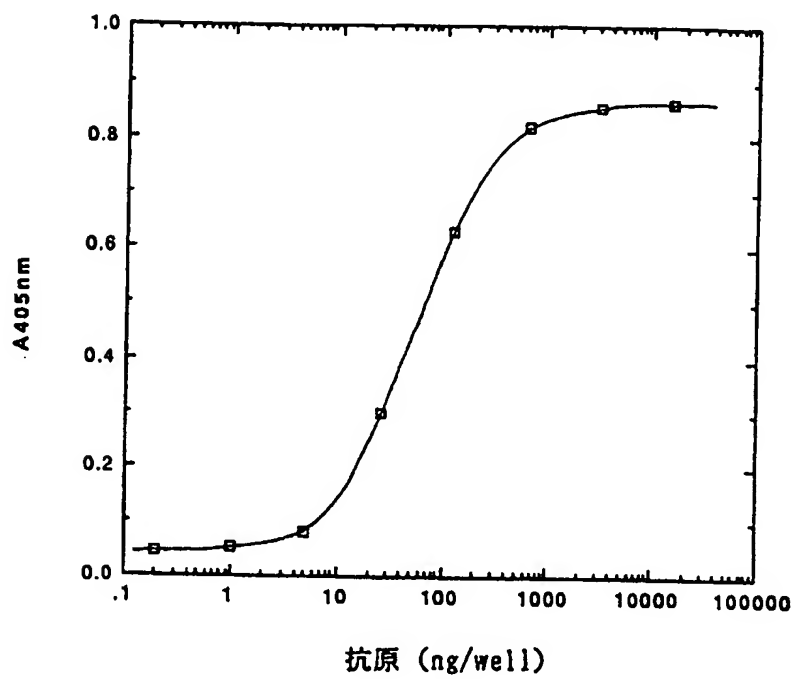


第 4 図

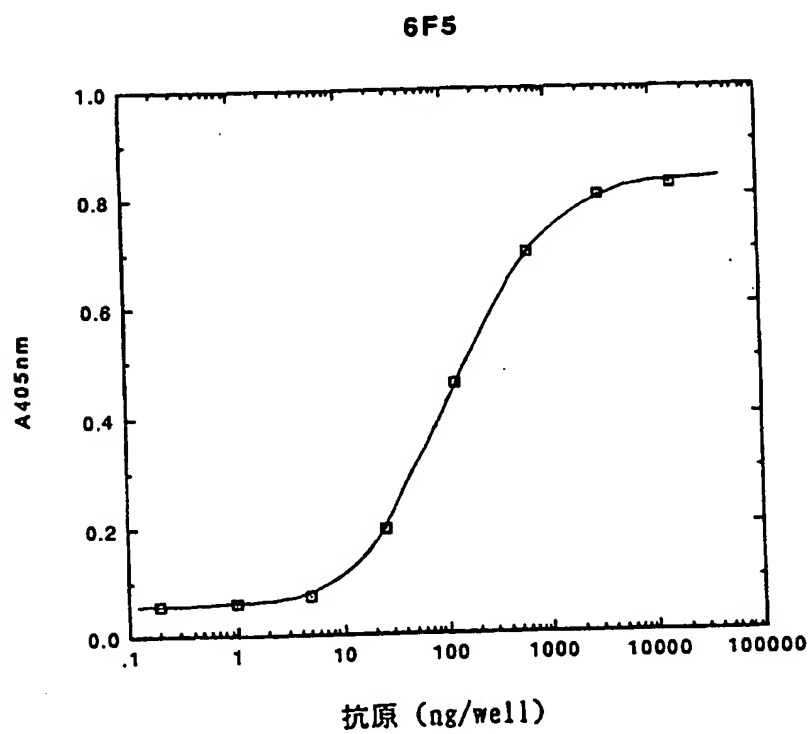


第 5 図

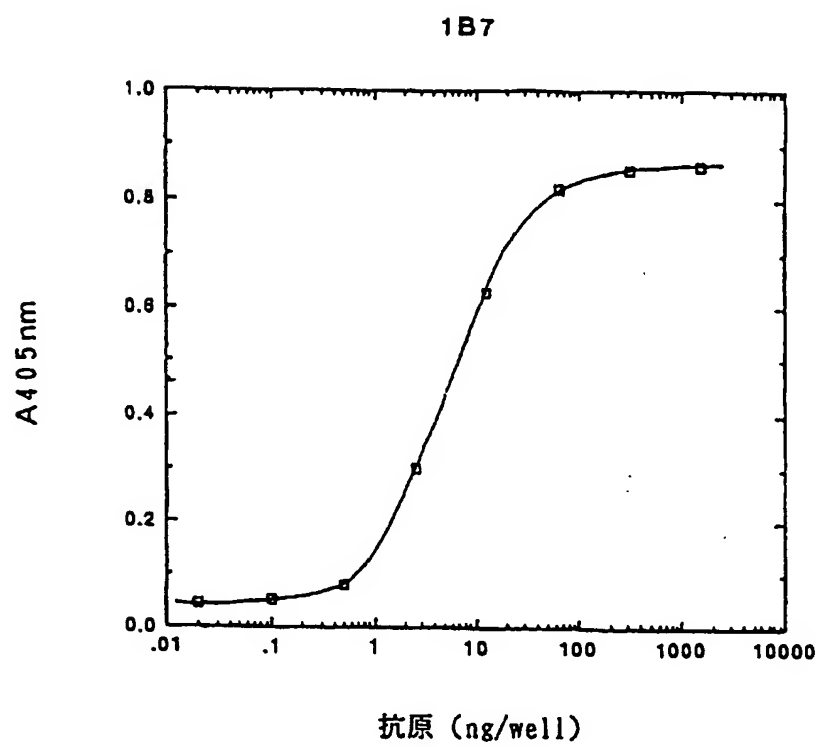
1B7



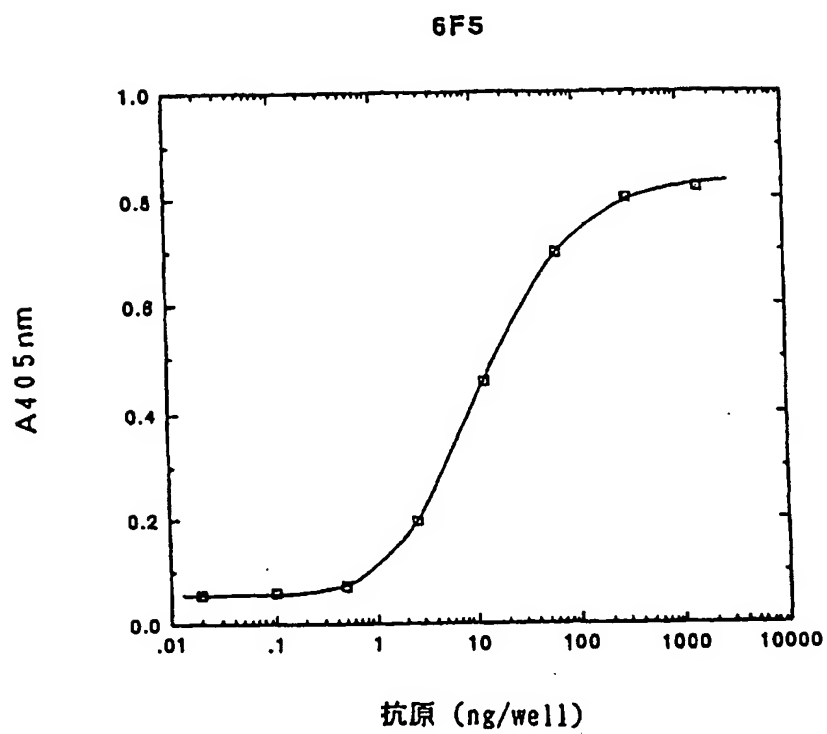
第 6 図



第 7 図

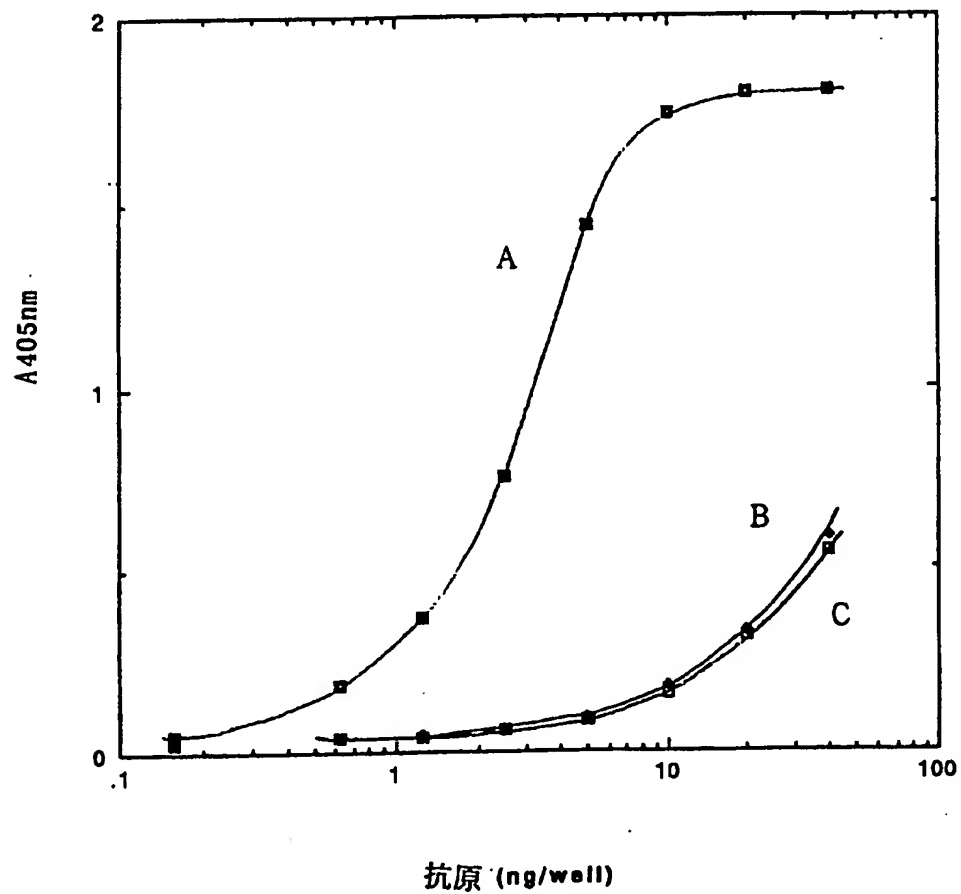


第 8 図



第 9 図

サンドイッチELISA 法に用いる抗体の組み合わせ



一次抗体：モノクローナル抗体1B7

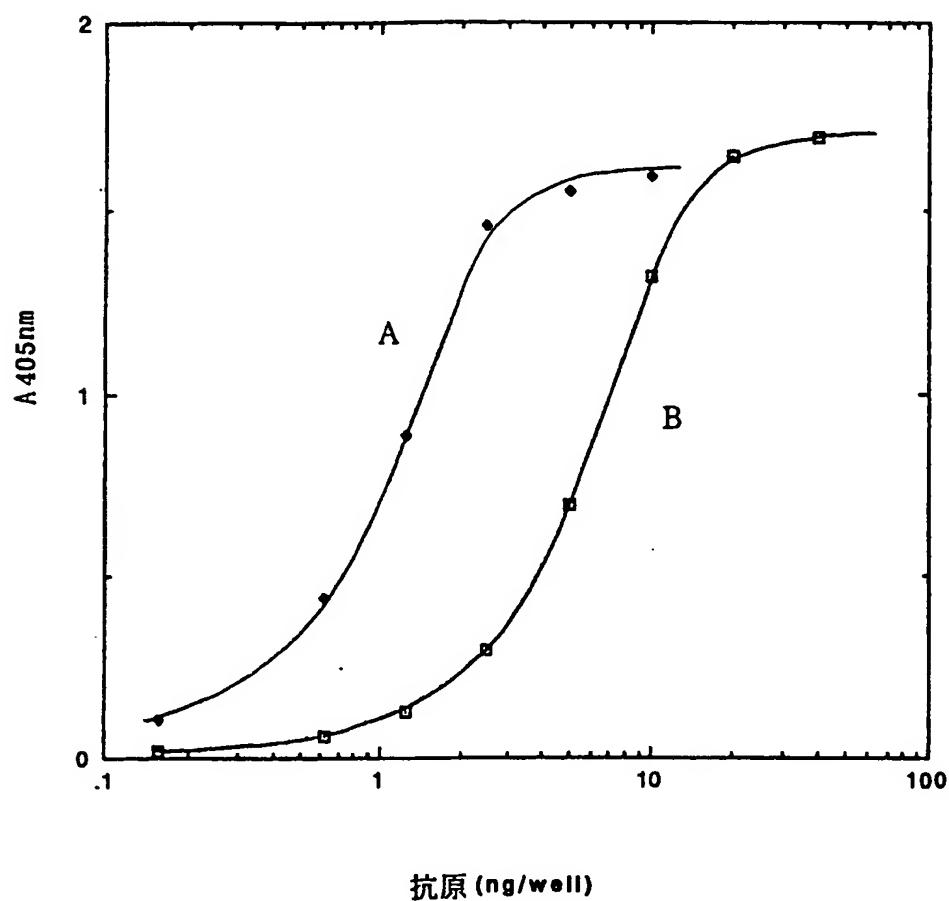
A 二次抗体：ビオチン化ポリクローナル抗体

B 二次抗体：ビオチン化7F5

C 二次抗体：ビオチン化10A3

第10図

サンドイッチELISA 法に用いる抗体の組み合わせ



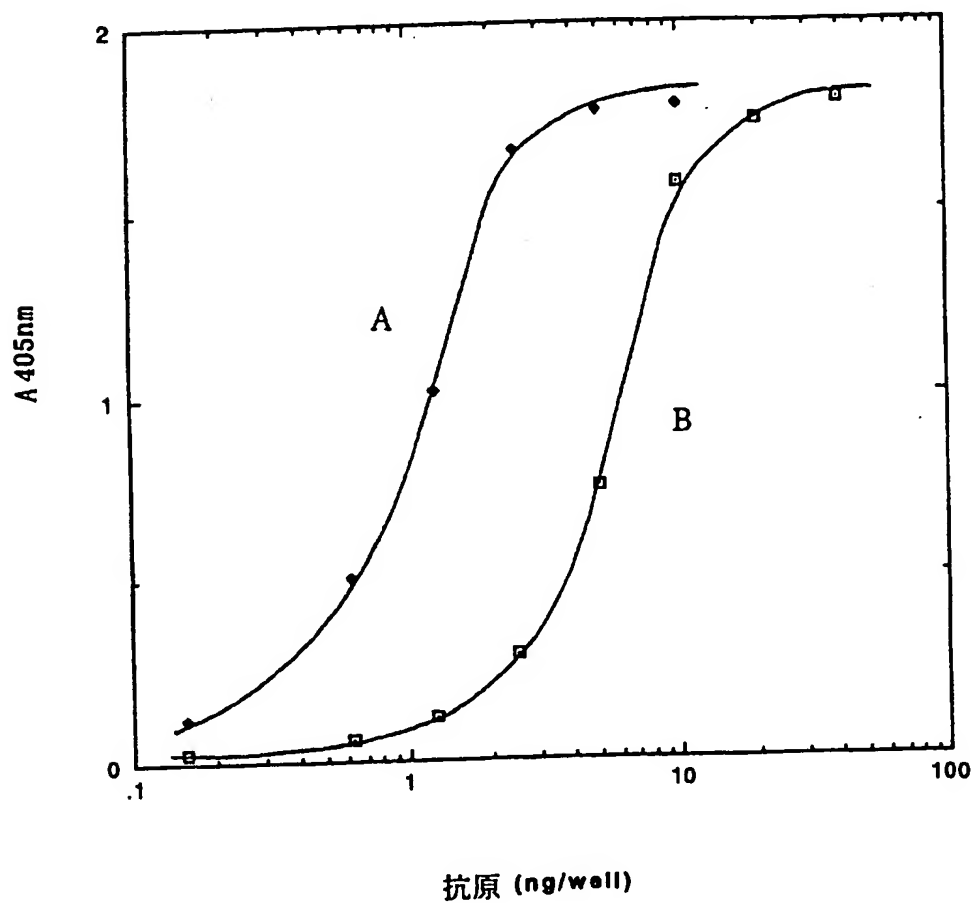
一次抗体：モノクローナル抗体10A3

A 二次抗体：ビオチン化ポリクローナル抗体

B 二次抗体：ビオチン化1B7

第11図

サンドイッチELISA 法に用いる抗体の組み合わせ

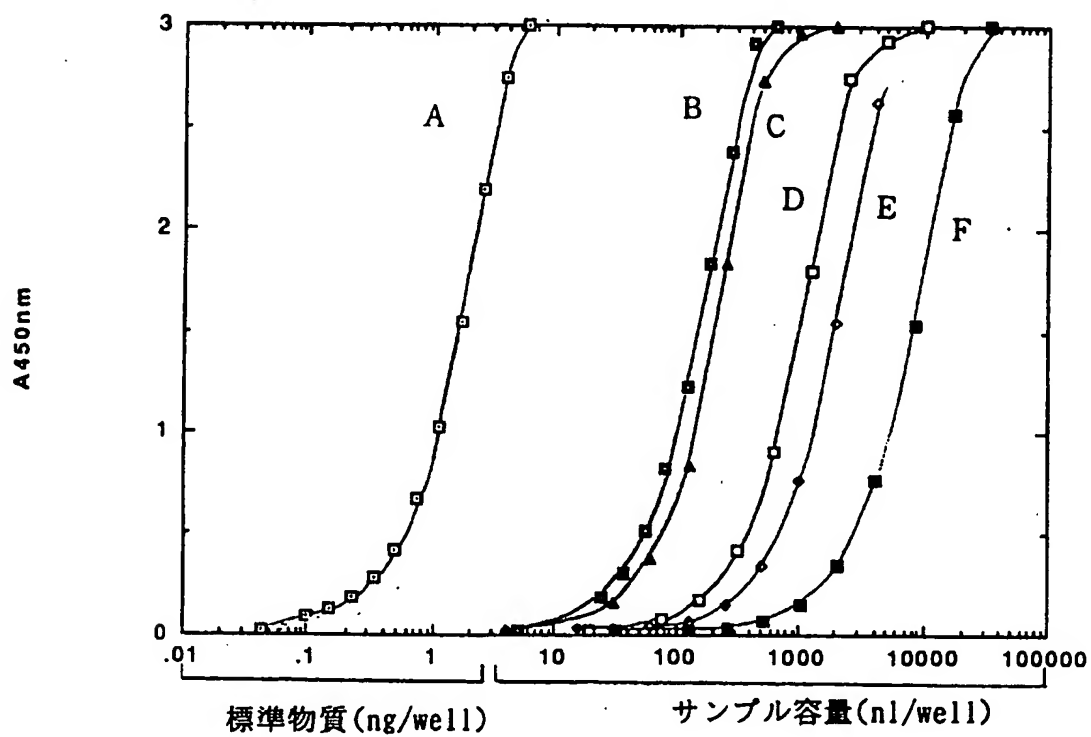


一次抗体：モノクローナル抗体7F5

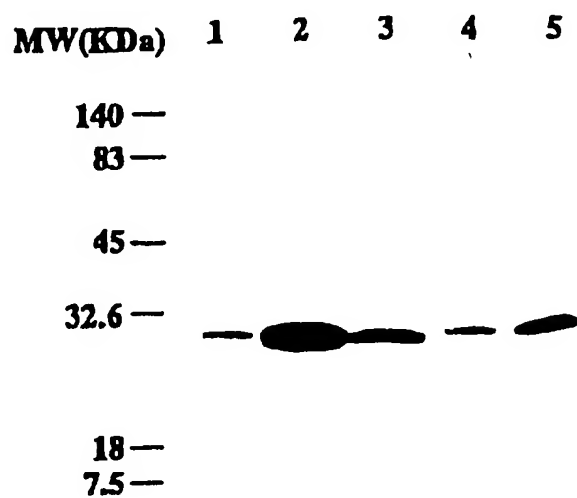
A 二次抗体：ビオチン化ポリクローナル抗体

B 二次抗体：ビオチン化1B7

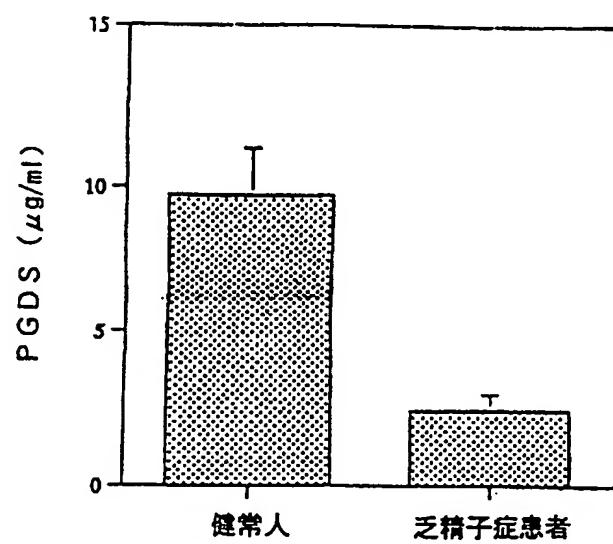
第12図



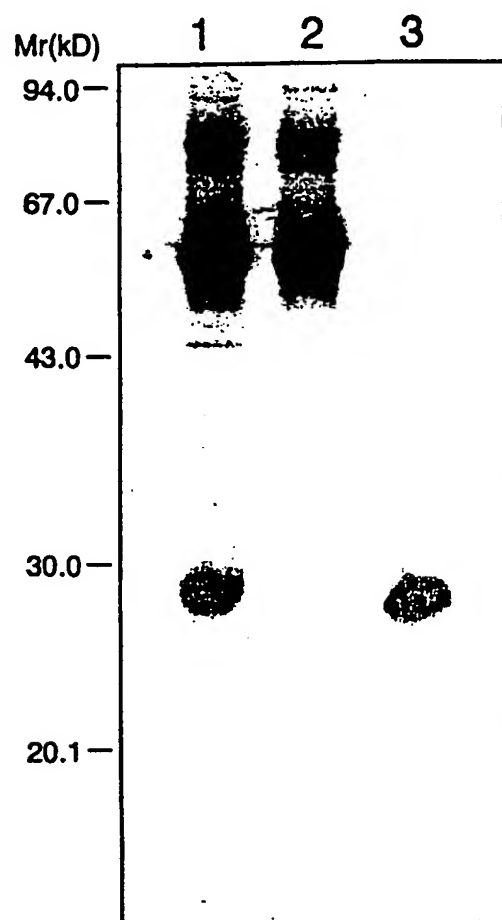
第13図



第14図



第15図



レーン1 : CSF (未精製)

レーン2 : ゲルに吸着しなかった画分 (通過画分)

レーン3 : 0.1M クエン酸ナトリウム(pH3.0) による溶出画分

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03190

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C07K16/40, C12N15/08, C12P21/08, G01N33/536, G01N33/573

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C07K16/40, C12N15/08, C12P21/08, G01N33/536, G01N33/573

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Watanabe, K. et al. "Identification of beta-trace as prostaglandin D synthetase" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1994) Vol. 203, No. 2, p. 1110-1116	1 - 3
Y	Nagata, A. et al. "Human brain prostaglandin D synthetase has been evolutionarily differentiated from lipophilic-ligand carrier proteins" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) Vol. 88, p. 4020-4024	1 - 3
X Y	Urade, Y. et al. "Postnatal Changes in the Localization of Prostaglandin D Synthetase from Neurons to Oligodendrocytes in the Rat Brain" J. Biol. Chem. (1987) Vol. 262, No. 31, p. 15132-15136	1-4, 7 1-3, 5-6, 8-9
X Y	Masayoshi, T. et al. "Brain-type prostaglandin D synthetase occurs in the rat cochlea" Pros. Natl. Acad. Sci. USA (1987) Vol. 84, p. 7677-7680	1-4, 7 5-6, 8-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 23, 1997 (23. 01. 97)

Date of mailing of the international search report

February 4, 1997 (04. 02. 97)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03190

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Olsson, J.E. et al. "Correlation between the concentration of beta-trace protein and the number of spermatozoa in human semen." Journal of reproduction and fertility (1975) Vol. 42, No. 1, p. 149-151	5-6, 8-9
Y	Shimizu, T. et al. "Purification and Properties of Prostaglandin D synthetase from Rat Brain" J. Biol. Chem. (1979) Vol. 254, No. 12, p. 5222-5228	1 - 3
Y	Urade, Y. et al. "Purification and Characterization of Rat Brain Prostaglandin D Synthetase" J. Biol. Chem. (1985) Vol. 260, No. 23, p. 12410-12415	1 - 3
Y	Urade, Y. et al. "Mast Cells Contain Spleen-type Prostaglandin D Synthetase" J. Biol. Chem. (1990) Vol. 265, No. 1, p. 371-375	1 - 3
Y	Urade, Y. et al. "Biochemical and Immunological Characterization of Rat Spleen Prostaglandin D Synthetase" J. Biol. Chem. (1987) Vol. 262, No. 8, p. 3820-3825	1 - 3
A	Urade, Y. et al. "Primary Structure of Rat Brain Prostaglandin D Synthetase Deduced from cDNA Sequence" J. Biol. Chem. (1989) Vol. 264, No. 2, p. 1041-1045	1 - 9
T	Dimtrois, N. M. et al. "Immunofluorometric assay of prostaglandin D synthase in human tissue extracts and fluids" Clin. Chem. (1996, Dec.) Vol. 42, No. 12, p. 1984-1991	1 - 9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C07K16/40, C12N15/08, C12P21/08, G01N33/536, G01N33/573

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C07K16/40, C12N15/08, C12P21/08, G01N33/536, G01N33/573

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Watanabe, K. et al. "Identification of beta-trace as prostaglandin D synthetase" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1994) 第203巻 第2号 p. 1110-1116	1-3
Y	Nagata, A et al. "Human brain prostaglandin D synthetase has been evolutionarily differentiated from lipophilic-ligand carrier proteins" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) 第88巻 p. 4020-4024	1-3
X Y	Urade, Y. et al. "Postnatal Changes in the Localization of Prostaglandin D Synthetase from Neurons to Oligodendrocytes in the Rat Brain" J. Biol. Chem. (1987) 第262巻 第31号 p. 15132-15136	1-4, 7 1-3, 5-6, 8-9
X Y	Masayoshi, T. et al. "Brain-type prostaglandin D synthetase occurs in the rat cochlea" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 第84巻 p. 7677-7680	1-4, 7 5-6, 8-9

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 01. 97

国際調査報告の発送日

04.02.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4B

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Olsson, J. E. et al. "Correlation between the concentration of beta-trace protein and the number of spermatozoa in human semen." Journal of reproduction and fertility (1975) 第42巻 第1号 p. 149-151	5-6, 8-9
Y	Shimizu, T. et al. "Purification and Properties of Prostaglandin D Synthetase from Rat Brain" J. Biol. Chem. (1979) 第254巻 第12号 p. 5222-5228	1-3
Y	Urade, Y. et al. "Purification and Characterization of Rat Brain Prostaglandin D Synthetase" J. Biol. Chem. (1985) 第260巻 第23号 p. 12410-12415	1-3
Y	Urade, Y. et al. "Mast Cells Contain Spleen-type Prostaglandin D Synthetase" J. Biol. Chem. (1990) 第265巻 第1号 p. 371-375	1-3
Y	Urade, Y. et al. "Biochemical and Immunological Characterization of Rat Spleen Prostaglandin D Synthetase" J. Biol. Chem. (1987) 第262巻 第8号 p. 3820-3825	1-3
A	Urade, Y. et al. "Primary Structure of Rat Brain Prostaglandin D Synthetase Deduced from cDNA Sequence" J. Biol. Chem. (1989) 第264巻 第2号 p. 1041-1045	1-9
T	Dimtrois, N. M. et al. "Immunofluorometric assay of prostaglandin D synthase in human tissue extracts and fluids" Clin. Chem. (1996, Dec) 第42巻 第12号 p. 1984-1991	1-9

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.